



IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In Re the Application of : **Remo GUERRINI, et al.**
Filed : **September 24, 2003**
For : **ANALOGS OF NOCICETTIN**
Serial No. : **10/670,161**
Art Unit :
Confirmation No. : **2834**
Examiner : **3661**

Director of the U.S. Patent and
Trademark Office
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

January 30, 2004

SUBMISSION OF PRIORITY DOCUMENT


S I R:

Applicant hereby submits a certified copy of **ITALIAN** patent application no.

MI 2002 A 002022 filed **September 24, 2002**, from which priority was claimed in
a priority claim filed on September 24, 2003.

Any fee, due as a result of this paper may be charged to Deposit Acct. No. 50-
1290.

Respectfully submitted,



Thomas J. Bean
Reg. No. 44,528

CUSTOMER NO.: 026304
KATTEN MUCHIN ZAVIS ROSENMAN
575 MADISON AVENUE
IP Department
NEW YORK, NEW YORK 10022-2585
DOCKET NO.: SAIC 20.634 (100788-00066)
TELEPHONE: (212) 940-8800



Ministero delle Attività Produttive
Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività
Ufficio Italiano Brevetti e Marchi
Ufficio G2

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per: **Invenzione Industriale**

N. **MI2002 A 002022**



*Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali
depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati
risultano dall'accluso processo verbale di deposito.*

Inoltre Nota di Trascrizione depositata alla Camera di Commercio di Milano n. MIE000692 il 06/06/2003
(pag. 1).

Roma, li 17 DIC. 2003

SIL DIRIGENTE

Ing. DI CARLO

AL MINISTERO DELLE ATTIVITÀ PRODUTTIVE

UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI - ROMA

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE DEPOSITO RISERVE ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO

MODULO A

A. RICHIEDENTE (I)

1) Denominazione GUERRINI REMO
Residenza Ferrara codice GRRRME64A10A965L
2) Denominazione CALO' GIROLAMO
Residenza Ferrara codice CLAGLM65C27D548S

B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome nome Bianchetti Giuseppe ed altri cod. fiscale _____
denominazione studio di appartenenza Bianchetti Braeco Minoja s.r.l.
via Rossini n. 8 città Milano cap 20122 (prov) MI

C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario

via _____ n. _____ città _____ cap _____ (prov) _____

D. TITOLO

classe proposta (sez/cl/scl) _____

gruppo/sottogruppo _____/_____/_____

"Analoghi di nocicettina"

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO:

SI ☐ NO ☒

SE ISTANZA: DATA _____/_____/_____

N° PROTOCOLLO _____

E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome

cognome nome

1) Guerrini Remo 3) Salvadori Severo
2) Calò Girolamo 4) Regoli Domenico

F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione

tipo di priorità

numero di domanda

data di deposito

allegato
S/R

1) _____/_____/_____
2) _____/_____/_____

SCIoglimento RISERVE

Data

N° Protocollo

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA CULTURE DI MICRORGANISMI, denominazione

H. ANNOTAZIONI SPECIALI

DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.

Doc. 1) 12 PROV n. pag. 120 riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare)
Doc. 2) 0 PROV n. tav. _____ disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare)
Doc. 3) 1 RIS lettera d'incarico, procura e riferimento procura generale
Doc. 4) 0 RIS designazione inventore
Doc. 5) 0 RIS documenti di priorità con traduzione in italiano
Doc. 6) 0 RIS autorizzazione o atto di cessione
Doc. 7) 0 nominativo completo del richiedente

8) attestati di versamento, totale Euro

Centottantotto/51#

obbligatorio

COMPILATO IL 24/09/2002

FIRMA DEL(I) RICHIEDENTE(I)

Banfi PaoloCONTINUA SI/NO SIDEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SI/NO SICAMERA DI COMMERCIO IND. ART. E AGR. DI MILANOMILANOcodice 1515

VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA

MI2002A 002022

Reg. A.

L'anno DUEMILADUEil giorno VENTIQUATTROdel mese di SETTEMBREil(i) richiedente(i) sopraindicato(i) ha(hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda corredata di 01 fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto soprariportato.

I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE

DEPOSITANTE

dell'Ufficio

L'UFFICIALE ROGANTE

M. CORTONESI

A. RICHIEDENTE (I)

03	Denominazione	SALVADORI SEVERO	PF
	Residenza	Ferrara	codice SLVSVR48M06I632D
04	Denominazione	REGOLI DOMENICO	PF
	Residenza	Ferrara	codice RGLDNC33E16E715J
	Denominazione		
	Residenza		codice
	Denominazione		
	Residenza		codice
	Denominazione		
	Residenza		codice
	Denominazione		
	Residenza		codice

E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome	cognome nome

F. PRIORITA

nazione o organizzazione	tipo di priorit�	numero di domanda	data di deposito	allegato S/R

SCIOGLIMENTO RISERVE

Data N  Protocollo

FIRMA DEL (I) RICHIEDENTE (I)

Banfi Paolo

Paolo Banfi

REG. A

NUMERO BREVETTO _____

DATA DI RILASCIO / /

D. TITOLO

"Analoghi di nocicettina"

L. RIASSUNTO

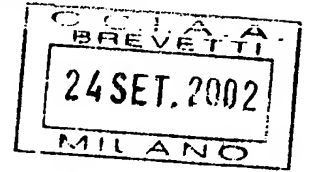
Si descrivono peptidi analoghi di nocicettina, composizioni farmaceutiche contenenti gli stessi e il loro utilizzo nel trattamento di disfunzioni, condizioni o stati patologici in cui sia desiderabile ottenere l'attivazione dei recettori NOP.



M. DISEGNO

6799 M Descrizione del brevetto per invenzione industriale avente per titolo:

PB/mc "ANALOGHI DI NOCICETTINA"



a nome : 1. GUERRINI REMO; 2. CALO' GIROLAMO;
3. SALVADORI SEVERO; 4. REGOLI DOMENICO

residenti in: 1.; 2.; 3 e 4: Ferrara

MI 2002A 002022

* * *

La presente invenzione riguarda peptidi analoghi di nocicettina in grado di modulare l'attività del recettore ORL1 (Opioid Receptor Like 1), composizioni farmaceutiche che li contengono e il loro impiego nel trattamento di disfunzioni, condizioni o stati patologici in cui è coinvolto lo stesso recettore.

SFONDO DELL'INVENZIONE

Nel 1994 è stato clonato un nuovo recettore strutturalmente simile ai recettori oppioidi, chiamato "opiod receptor like 1" (ORL1 - secondo le recenti raccomandazioni dello IUPHAR, il nome più appropriato è NOP). Il suo ligando endogeno (nocicettina/orfanina FQ, N/OFQ), identificato alla fine del 1995, è un eptadecapeptide simile ad alcuni peptidi oppioidi (es. dinorfina A), che però non si lega a recettori oppioidi classici di tipo mu (MOP), delta (DOP) o kappa (KOP). Gli effetti cellulari mediati dal recettore NOP sono simili a quelli evocati dai classici recettori oppioidi. Da un punto di vista strutturale e trasduzionale il sistema recettore/peptide N/OFQ-NOP appartiene alla famiglia degli oppioidi, sebbene risulti farmacologicamente distinto. Nel periodo 1996-98, diversi studi dimostrarono che N/OFQ può modulare varie funzioni sia nel sistema nervoso centrale (dolore, ansietà, apprendimento, memoria, abuso di droghe, appetito) sia a livello periferico (pressione

sanguigna, ritmo cardiaco, funzione renale, gastrointestinale, genitourinaria e respiratoria) (per maggiori dettagli si veda Massi *et al.*, *Peptides* 21, 2000).

I presenti inventori a partire dal 1996 hanno svolto ricerche sul sistema N/OFQ-NOP, che hanno portato all'identificazione di particolari ligandi per il recettore NOP quali* a) N/OFQ(1-13)NH₂, che rappresenta il frammento minimo funzionale con la stessa attività del ligando naturale N/OFQ (Calo *et al.*, *Eur J Pharmacol* 311, R3-5, 1996), b) N/OFQ-NH₂ che, specialmente in vivo, produce effetti più intensi e prolungati rispetto a N/OFQ (Rizzi *et al.*, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 363, 161-165, 2001), c) [Tyr¹]N/OFQ(1-13)NH₂, un agonista misto che agisce su NOP e sui classici recettori oppioidi (Calo *et al.*, *Can J Physiol Pharmacol* 75, 713-8, 1997; Varani *et al.*, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 360, 270-7, 1999), d) [Phe¹Ψ(CH₂-NH)Gly²]N/OFQ(1-13)NH₂, un ligando selettivo del recettore NOP che si comporta come antagonista puro, agonista parziale o anche come agonista pieno in maniera dipendente dalla preparazione (Guerrini *et al.*, *Br J Pharmacol* 123, 163-5, 1998; Okawa *et al.*, *Br J Pharmacol* 127, 123-30, 1999) - dall'analisi dettagliata dell'azione farmacologica di [Phe¹Ψ(CH₂-NH)Gly²]N/OFQ(1-13)NH₂ riportata in Calo' *et al.* (*Peptides* 21, 935-47, 2000), risulta che questo composto è effettivamente un agonista parziale di NOP, e) [Nphe¹]N/OFQ(1-13)NH₂, il primo antagonista competitivo puro selettivo per il recettore NOP (Calo *et al.*, *Br J Pharmacol* 129, 1183-93, 2000; Guerrini *et al.*, *J Med Chem* 15, 2805-13, 2000). Le azioni di questi ligandi sono state caratterizzate in diversi saggi in vitro e in vivo (si veda Calo *et al.*, *Br J Pharmacol* 129, 1261-83, 2000). Più di recente, il residuo Phe⁴ è stato sostituito con pFPhe o pNO₂Phe ottenendo così agonisti potenti,

selettivi per NOP (Guerrini *et al.*, *J Med Chem* **44**, 3956-64, 2001). Un altro composto interessante, [Arg¹⁴,Lys¹⁵]N/OFQ, è stato identificato come agonista ad elevata potenza (17 volte più potente di N/OFQ), selettivo verso recettori NOP umani ricombinanti espressi in cellule HEK293 (Okada *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun* **278**, 493-8, 2000). Le azioni di questo ligando sono state ulteriormente caratterizzate in vitro in tessuti isolati sensibili a N/OFQ e in vivo nel topo (Rizzi *et al.*, *J Pharmacol Exp Ther* **300**, 57-63, 2002).

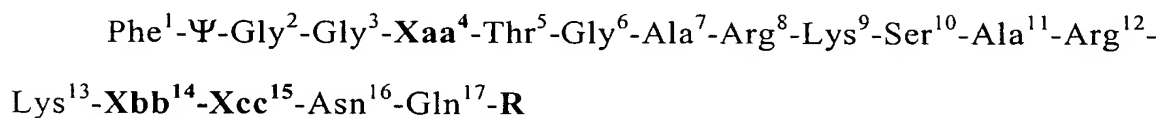
Analoghi di N/OFQ sono stati descritti in WO 99/07212, WO 97/07208, WO 99/03491 and WO 99/03880. Per questi si riporta un'utilità nel trattamento/prevenzione di malattie correlate a iperalgesia, funzioni neuroendocrine, stress, attività locomotoria e ansietà.

*La sequenza di riferimento per il peptide nocicettina è la seguente:

H-Phe-Gly-Gly-Phe-Thr-Gly-Ala-Arg-Lys-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Ala-Asn-Gln-OH

DESCRIZIONE DELL'INVENZIONE

Oggetto della presente invenzione sono peptidi analoghi di nocicettina, di formula generale (I)



(I)

dove

Ψ rappresenta il legame tra i primi due residui amminoacidici ed è scelto tra CO-NH e CH₂-NH; Xaa⁴ è pXPhe dove "X" rappresenta H, Cl, Br, I, F, NO₂, CN e "p" indica la posizione para- all'anello fenilico di Phe; Tic,

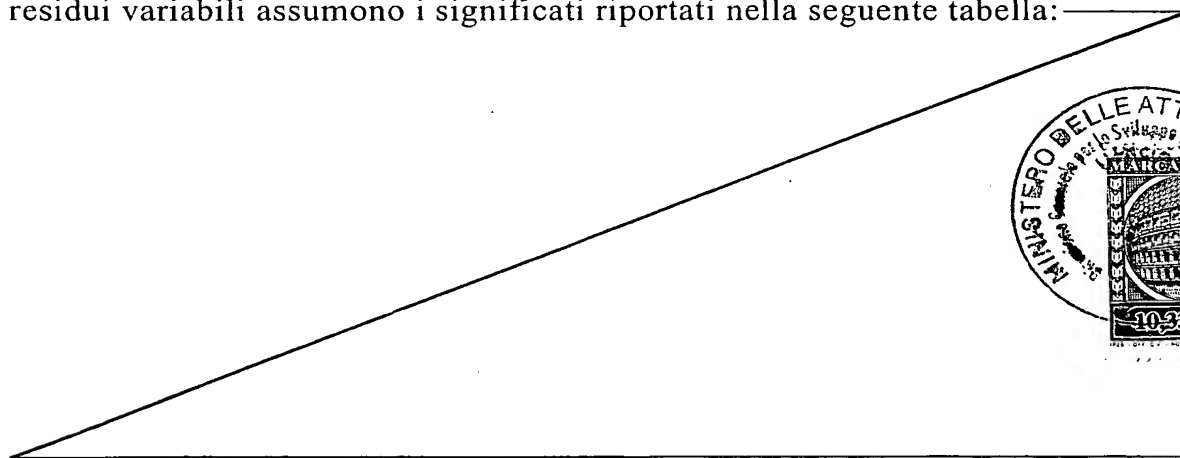
Phg, Atc, Aic, che rappresentano rispettivamente acido tetraidroisochinolin-3-carbossilico, fenilglicina, acido aminotetralincarbossilico, acido aminoindancarbossilico; Xbb^{14} è Trp, Arg, Lys, Leu, Orn, omoArg, acido diaminobutirrico, acido diaminopropionico; Xcc^{15} è Phe, Arg, Lys, Ala, Orn, Trp; **R** rappresenta un gruppo ammidico ($-NH_2$) o carbossilico ($-OH$) terminale; dove i residui amminoacidici o i loro derivati possono essere in configurazione D o, preferibilmente, L.

L'invenzione comprende inoltre i sali farmaceuticamente accettabili dei composti (I), in particolare i sali di acidi organici e minerali, quali cloridrati, bromidrati, fosfati, solfati, acetati, succinati, ascorbati, tartrati, gluconati, benzoati, malati, fumarati e stearati.

Sono preferiti i composti (I) in cui Ψ è $CO-NH$ o CH_2-NH , Xaa^4 è pXPhe dove "pX" è come sopra definito, Xbb^{14} è Arg, Lys, Leu o Orn; Xcc^{15} è Arg, Lys, Ala, Orn o Trp; **R** è $-NH_2$ o $-OH$.

Sono maggiormente preferiti i composti (I) in cui Ψ è $CO-NH$ o CH_2-NH ; Xaa^4 è L-pFPhe o L-pNO₂Phe; Xbb^{14} è L-Arg, L-Lys o L-Leu; Xcc^{15} è L-Arg, L-Lys o L-Ala; **R** è $-NH_2$.

Ancora più preferiti sono gli analoghi peptidici di formula (I) in cui i residui variabili assumono i significati riportati nella seguente tabella:



	Ψ	Xaa	Xbb	Xcc	R
1	CO-NH	(pF)Phe	Arg	Lys	NH ₂
2	CH ₂ -NH	(pF)Phe	Arg	Lys	NH ₂
3	CO-NH	(pF)Phe	Arg	Arg	NH ₂
4	CH ₂ -NH	(pF)Phe	Arg	Arg	NH ₂
5	CO-NH	(pF)Phe	Lys	Lys	NH ₂
6	CH ₂ -NH	(pF)Phe	Lys	Lys	NH ₂
7	CO-NH	(pF)D-Phe	Arg	Lys	NH ₂
8	CH ₂ -NH	(pF)D-Phe	Arg	Lys	NH ₂
9	CO-NH	(pF)D-Phe	Arg	Arg	NH ₂
10	CH ₂ -NH	(pF)D-Phe	Arg	Arg	NH ₂
11	CO-NH	(pF)Phe	Arg	Ala	NH ₂
12	CH ₂ -NH	(pF)Phe	Arg	Ala	NH ₂
13	CO-NH	(pF)D-Phe	Leu	Lys	NH ₂
14	CH ₂ -NH	(pF)D-Phe	Leu	Lys	NH ₂
15	CO-NH	(pF)Phe	D-Arg	Lys	NH ₂
16	CH ₂ -NH	(pF)Phe	D-Arg	Lys	NH ₂
17	CO-NH	(pNO ₂)Phe	Arg	Lys	NH ₂
18	CH ₂ -NH	(pNO ₂)Phe	Arg	Lys	NH ₂
19	CO-NH	(pNO ₂)Phe	Lys	Lys	NH ₂
20	CH ₂ -NH	(pNO ₂)Phe	Lys	Lys	NH ₂
21	CO-NH	(pNO ₂)Phe	Arg	Arg	NH ₂
22	CH ₂ -NH	(pNO ₂)Phe	Arg	Arg	NH ₂
23	CO-NH	(pNO ₂)Phe	Lys	D-Lys	NH ₂

(continua)

	Ψ	Xaa	Xbb	Xcc	R
24	CH ₂ -NH	(pNO ₂)Phe	Lys	D-Lys	NH ₂
25	CO-NH	(pNO ₂)D-Phe	Arg	Lys	NH ₂
26	CH ₂ -NH	(pNO ₂)D-Phe	Arg	Lys	NH ₂
27	CO-NH	(pNO ₂)D-Phe	Arg	Arg	NH ₂
28	CH ₂ -NH	(pNO ₂)D-Phe	Arg	Arg	NH ₂
29	CO-NH	(pNO ₂)Phe	Arg	Ala	NH ₂
30	CH ₂ -NH	(pNO ₂)Phe	Arg	Ala	NH ₂
31	CO-NH	(pNO ₂)Phe	Leu	Lys	NH ₂
32	CH ₂ -NH	(pNO ₂)Phe	Leu	Lys	NH ₂
33	CO-NH	(pNO ₂)Phe	D-Arg	D-Lys	NH ₂
34	CH ₂ -NH	(pNO ₂)Phe	D-Arg	D-Lys	NH ₂
35	CO-NH	(pNO ₂)Phe	Leu	D-Lys	NH ₂
36	CH ₂ -NH	(pNO ₂)Phe	Leu	D-Lys	NH ₂
37	CO-NH	(pF)Phe	Arg	Lys	OH
38	CH ₂ -NH	(pF)Phe	Arg	Lys	OH
39	CO-NH	(pNO ₂)Phe	Arg	Lys	OH
40	CH ₂ -NH	(pNO ₂)Phe	Arg	Lys	OH
41	CO-NH	(pNO ₂)Phe	Lys	Lys	OH
42	CH ₂ -NH	(pNO ₂)Phe	Lys	Lys	OH
43	CO-NH	(pF)Phe	Arg	Arg	OH
44	CH ₂ -NH	(pF)Phe	Arg	Arg	OH

Tra questi, maggiormente preferiti sono i composti in cui Ψ è CO-NH o CH₂-NH; **Xaa**⁴ è L-pFPhe; **Xbb**¹⁴ è L-Arg; **Xcc**¹⁵ è L-Lys e **R** è -NH₂, rappresentati dalle seguenti formule:

a) H-Phe-Gly-Gly-(pF)Phe-Thr-Gly-Ala-Arg-Lys-Ser-Ala-Arg-Lys-Arg-Lys-Asn-Gln-NH₂

b) H-Phe-Ψ(CH₂NH)-Gly-Gly-(pF)Phe-Thr-Gly-Ala-Arg-Lys-Ser-Ala-Arg-Lys-Arg-Lys-Asn-Gln-NH₂

Gli analoghi peptidici secondo l'invenzione possono essere sintetizzati con varie tecniche note dalla letteratura, si veda ad esempio Schroeder et al. "The Peptides" vol 1, Academic Press, 1965; Bodanszky et al. "Peptide Synthesis" Interscience Publisher, 1966; Barany & Merrifield, "The peptides; Analysis, Synthesis, Biology", 2, Academic Press, 1980; E. Atheron e R.C. Sheppard, "Solid Phase Peptide Synthesis" IRL Press at Oxford University Press 1989; J. Jones, "The Chemical Synthesis of Peptides", Claredon Press, Oxford 1994. Queste tecniche includono sintesi peptidica in fase solida o in soluzione, metodiche sintetiche di chimica organica, oppure una qualunque combinazione di esse. Lo schema di sintesi prescelto dipenderà naturalmente dalla composizione del particolare peptide. Di preferenza sono impiegate metodiche sintetiche basate su appropriate combinazioni di tecniche in fase solida e metodi classici in soluzione, che comportano bassi costi produttivi, particolarmente su scala industriale. Nel dettaglio tali metodiche consistono nella:

i) Sintesi in soluzione di frammenti della catena peptidica attraverso l'accoppiamento successivo di amminoacidi N-protetti, opportunamente attivati, ad un amminoacido o ad una catena peptidica C-protetta, con isolamento degli intermedi, successiva deprotezione selettiva delle estremità N e C-terminali di detti frammenti e loro accoppiamento ripetuto fino all'ottenimento del peptide desiderato. Dove necessario, si deproteggono le catene laterali.

ii) Sintesi in fase solida della catena peptidica dall'estremità C-

terminale verso quella N-terminale su di un supporto polimerico insolubile. Il peptide viene rimosso dalla resina per idrolisi con acido fluoridrico anidro o con acido trifluoroacetico, con concomitante deprotezione delle catene laterali.

Al termine della sintesi i peptidi possono essere purificati e isolati per trattamento con opportuni solventi e mediante tecniche cromatografiche quali HPLC.

Gli analoghi peptidici secondo l'invenzione agiscono come agonisti del recettore NOP. L'attività intrinseca di ciascun composto può variare in base al tipo di residuo presente nelle posizioni variabili della sequenza. Per esempio si è osservata un'attività di agonista pieno per il composto (a) e di agonista parziale per il composto (b). In ogni caso, tutta la classe di composti (I) ha dimostrato una maggiore potenza e durata d'azione rispetto al peptide di riferimento nocicettina. Nel complesso i risultati delle prove in vitro e in vivo dimostrano l'efficacia biologica e farmacologica dei peptidi dell'invenzione.

Secondo un altro aspetto, l'invenzione è diretta a composizioni farmaceutiche contenenti gli analoghi peptidici qui descritti, eventualmente in combinazione con veicoli ed eccipienti farmaceuticamente accettabili. Le composizioni dell'invenzione possono essere somministrate per via orale o parenterale, per esempio respiratoria, rettale, spinale, intratecale e topica, in forma di preparazione iniettabile, capsula, compressa, granulato, soluzione, sospensione, sciroppo, supposta, spray nasale, crema, pomata, gel, preparazione a rilascio controllato o altro. I principi e i metodi per la preparazione di composizioni farmaceutiche sono noti agli esperti del settore e sono descritti per esempio in Remington's Pharmaceutical Sciences, 18° Edizione, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1990. Le composizioni farmaceutiche secondo l'invenzione conterranno una quantità efficace di peptidi (o loro derivati) che sarà generalmente



compresa tra 0,1 e 1000 mg, preferibilmente tra 0,1 e 500 mg. Il dosaggio giornaliero varierà in funzione del tipo di patologia/disfunzione da trattare, della forma e via di somministrazione, dell'età, sesso e peso del paziente, del suo stato generale di salute, e di altre variabili che dovranno essere valutate di volta in volta, ma in generale potrà essere compreso tra 0,1 e 1000 µg/Kg di peso corporeo.

In considerazione del profilo di attività mostrato nei saggi in vivo e in vitro dai peptidi dell'invenzione, le composizioni farmaceutiche contenenti gli stessi possono essere utilizzate per il trattamento di disfunzioni, condizioni o stati patologici in cui sia desiderabile ottenere una potente e prolungata attivazione dei recettori NOP, quali ipertensione, tachicardia, malattie da ritenzione idrica, iponatriemia, scompenso cardiaco, disfunzioni della motilità della muscolatura liscia nei tratti gastrointestinale, respiratorio, e genitourinario (specialmente incontinenza urinaria conseguente a vescica neurogena), stati infiammatori, oppure nell'analgesia periferica o spinale, in particolare nel trattamento degli stati dolorifici cronici, o ancora nell'attenuazione della tosse. L'alto peso molecolare dei composti e la presenza in essi di residui che possono caricarsi positivamente a pH fisiologici ne rendono improbabile l'attraversamento della barriera emato-encefalica. Anche se la distribuzione è prevalentemente periferica, tali composti possono esercitare effetti centrali a seguito di somministrazione locale, ad esempio possono indurre analgesia a livello del sistema nervoso centrale dopo somministrazione intratecale o spinale.

PARTE SPERIMENTALE

1. Preparazione dei peptidi

1.1 Schema generale di sintesi

I peptidi dell'invenzione sono stati preparati mediante sintesi in fase

solida usando una resina Fmoc-PAL-PEG. Gli amminoacidi protetti come flourenil-metil-ossicarbonil (Fmoc) sono stati assemblati con diisopropilcarbodiimide (DIPCDI) e 1-idrossibenzotriazolo (HOBT) come agenti d'accoppiamento. I gruppi Fmoc sono stati rimossi con piperidina 20% in dimetilformamide (DMF) e la resina legata al peptide protetto è stata trattata con il reagente K per ottenere il peptide grezzo. I composti contenenti un legame peptidico modificato tra i primi due residui amminoacidici ($\text{Phe}^1[\Psi(\text{CH}_2\text{NH})]\text{Gly}^2$) sono stati ottenuti mediante condensazione Boc-Phe-CHO sul peptide(2-17) protetto legato alla resina nell'ultimo passaggio di sintesi, riducendo in situ il derivato "immino" intermedio con NaBH_3CN .

L'HPLC preparativo è stato eseguito utilizzando un sistema Waters Delta Prep 4000 con una colonna d'assemblaggio C18 Waters Prep LC 40-mm (30x4 cm, 300 Å, dimensione particelle sferiche 15 µm), con gradiente binario formato da due solventi: A) acetonitrile 10% v/v in H_2O ; B) acetonitrile 60% v/v in H_2O entrambi contenenti 0.1% di acido trifluoroacetico (TFA) e gradiente lineare da 0 a 50% di solvente B in 25 min.

Lo stesso gradiente è stato utilizzato per l'analisi su colonna Alltech C18 (4,6 x 150 mm 5-µm dimensione particellare) in un periodo di 30 min usando i seguenti gradienti lineari: I) da 0 a 50% di solvente B, II) da 0 a 20% di solvente B e III) da 0 a 100% di solvente B. Tutti i peptidi mostravano meno dell'1% di impurezze quando monitorati a 220 nm.

I pesi molecolari dei composti sono stati determinati mediante Maldi-Tof usando uno spettrometro di massa Hewlett-Packard G2025 A LD-TOF. Per la rotazione ottica si è utilizzato un polarimetro Perkin-Elmer 241 con cella di 10 cm usando metanolo a una concentrazione peptidica dell'1%. Per

gli intermedi di alcuni peptidi si è condotta un'analisi spettroscopia ^1H NMR con strumentazione Bruker 200MHz.

1.2 Procedimento

Sono stati preparati gli analoghi peptidici riportati in tabella seguendo il procedimento qui descritto in dettaglio per la sintesi dei peptidi a) e b).

La resina Fmoc-PAL-PEG-PS (0.18 mmol/g, 0.2 g) è stata trattata con piperidina (20%) in DMF e legata con Fmoc-Gln(Trt)-OH attraverso il suo estere attivo N-idrossibenzotriazolo. I seguenti amminoacidi Fmoc sono stati accoppiati in sequenza alla catena peptidica in allungamento: Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-(pF)Phe-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Phe-OH. Tutti gli amminoacidi Fmoc (4 equiv) sono stati accoppiati alla catena peptidica in allungamento utilizzando 1,3-diisopropilcarbodiimmide (4 equiv) e 1-idrossibenzotriazolo (4 equiv) in DMF; la reazione di accoppiamento è stata condotta per un'ora. Si è utilizzata piperidina (20%) in DMF per rimuovere i gruppi Fmoc in ciascun passaggio. Dopo deprotezione dell'ultimo gruppo N^α -Fmoc, la resina peptidica è stata lavata con metanolo ed essiccata sotto vuoto a dare [(pF)Phe⁴, Arg¹⁴, Lys¹⁵]-NC(1-17)-PAL-PEG-PS-Resina protetta. Questa resina peptidica protetta è stata trattata con il reagente K (TFA / H₂O / fenolo / etanoditiolo / tioanisolo 82.5: 5: 5: 2.5: 5; v/v; 10 mL / 0.2 g di resina) per 1 h a temperatura ambiente. Dopo filtrazione della resina esausta, il solvente è stato concentrato sotto vuoto e il residuo triturato con etere. Il peptide grezzo è stato purificato mediante HPLC preparativa in fase inversa ottenendo una polvere

bianca dopo liofilizzazione.

La sintesi di [Phe¹Ψ(CO-NH) Gly², (pF)Phe⁴, Arg¹⁴, Lys¹⁵]-N/OFQ-NH₂ è stata effettuata a partire dall'intermedio [(pF)Phe⁴, Arg¹⁴, Lys¹⁵]-N/OFQ-(2-17)-resina sintetizzato come descritto sopra. Questo intermedio (0.2 g, 0.21 mmol/g, 0.042 mmol) è stato ricostituito in metanolo contenente 1% (V/V) acido acetico (2 mL). Dopo 20 min, una soluzione di Boc-Phe-CHO (0.016 g, 0.063 mmol) e NaBH₃CN (0.008 g, 0.13 mmol) disciolta in metanolo (0.4 mL) è stata aggiunta e la miscela di reazione tenuta sotto agitazione per 1h. Successivamente, la resina è stata lavata con metanolo e trattata con il reagente K come descritto sopra.

2. Prove farmacologiche

2.1 Saggi in vitro

I composti di tabella sono stati esaminati in vitro in diversi tessuti rispondenti a N/OFQ isolati da varie specie quali ratto, topo e cavia, e in cellule Chinese Hamster Ovary esprimenti il recettore NOP umano ricombinante (CHO_{hNOP}). Le condizioni adottate per lo studio degli effetti dei composti nei tessuti stimolati elettricamente (vaso deferens di topo e ratto, ileo di guinea pig) sono descritte in Bigoni et al. (*Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **359**, 160-7, 1999, qui incorporato per riferimento), mentre le condizioni adottate per lo studio degli effetti in cellule CHO_{hNOP} sono descritte in Okawa et al. (*Br J Pharmacol* **127**, 123-130, 1999, qui incorporato per riferimento). In ciascuna serie di esperimenti l'attività dei nuovi composti è stata comparata a quella del peptide naturale N/OFQ.

2.2 Saggi in vivo

I peptidi sono stati valutati in vivo per la loro capacità di mimare o



bloccare una serie di attività biologiche notoriamente mediate dal sistema recettoriale N/OFQ-NOP, quali: i) effetti pro-nocicettivi e anti-morfina indotti da N/OFQ a seguito di somministrazione intracerebroventricolare (i.c.v.) nel topo (Calo *et al.*, *Br J Pharmacol* **125**, 373-8, 1998, qui incorporato per riferimento), ii) inibizione dell'attività locomotoria spontanea evocata dall'iniezione i.c.v. di N/OFQ in topo (Rizzi *et al.*, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **363**, 161-5, 2001, qui incorporato per riferimento). Tutti questi effetti di N/OFQ possono essere efficacemente antagonizzati dall'antagonista NOP selettivo [Nphe¹]N/OFQ(1-13)NH₂. In ciascuna serie di esperimenti le azioni dei nuovi analoghi di N/OFQ sono state confrontate con quelle indotte dal peptide naturale N/OFQ. I dettagli riguardanti i test ed i protocolli sperimentali utilizzati sono descritti negli articoli citati.

2.3 Risultati

In tessuti isolati i composti aventi struttura [Phe¹Ψ(CO-NH)Gly²] mimavano gli effetti di N/OFQ, in particolare inducevano effetti massimali simili, agendo dunque come agonisti pieni, mentre i composti aventi struttura [Phe¹Ψ(CH₂-NH)Gly²] agivano come agonisti parziali producendo effetti massimali inferiori rispetto a N/OFQ. Inoltre, le potenze dei diversi composti variavano notevolmente, passando da valori superiori a quelli di N/OFQ (è per esempio il caso di [(pF)Phe⁴, Arg¹⁴, Lys¹⁵]-NC-NH₂), a valori simili ([(pCl)Phe⁴]-N/OFQ-NH₂) o inferiori ([(pI)Phe⁴]-N/OFQ-NH₂) a quelli del peptide di riferimento. I composti che agivano come agonisti di massima potenza o come agonisti parziali (ma sempre con potenze superiori a N/OFQ) mostravano valori di pEC₅₀ da 3 a 30 volte

superiori a N/OFQ a seconda della preparazione in esame. Gli stessi composti sono stati valutati per la loro capacità d'inibire l'accumulo di cAMP stimolato da forskolina in cellule CHO_{hNOP}. In questo modello tutti i composti agivano come agonisti pieni, il loro ordine di potenza essendo uguale a quello determinato nei tessuti isolati. I composti che agivano da agonisti ad alta potenza mostravano valori di pEC₅₀ > 3 volte superiori a N/OFQ. Gli effetti dei composti che si comportano da agonisti sono mediati dall'attivazione del recettore NOP, in quanto non vengono influenzati dal naloxone ma sono bloccati da [Nphe¹]N/OFQ(1-13)NH₂ che mostrava valori di pA₂ (6.0 – 6.4) simili quando testato rispetto a questi nuovi composti o rispetto a N/OFQ. Alcuni dei composti valutati in vitro sono stati inoltre testati in una batteria di saggi in vivo per funzioni biologiche regolate da N/OFQ. In tutti i saggi la maggior parte dei nuovi peptidi mimavano gli effetti evocati dal peptide naturale. Nel saggio di attività locomotoria alcuni composti sono stati testati a una dose i.c.v. di 1 nmol. Questi mimavano l'effetto inibitorio di N/OFQ, tuttavia mentre l'attività del peptide naturale durava circa 20 min, quella dei nuovi derivati era ancora presente dopo diverse ore. Alcuni analoghi come [(pF)Phe⁴,Arg¹⁴,Lys¹⁵]-N/OFQ-NH₂ risultavano più di 10 volte più potenti di N/OFQ. Risultati simili sono stati ottenuti anche nel saggio di "ritrazione della coda" nel topo dove i composti mimano l'effetto iperalgesico di N/OFQ.

A scopo esemplificativo nella seguente tabella si riportano i risultati ottenuti in vitro e in vivo con il composto [(pF)Phe⁴,Arg¹⁴,Lys¹⁵]-N/OFQ-NH₂ (UFP-102) e con il peptide di riferimento N/OFQ.

Tabella

studi in vitro

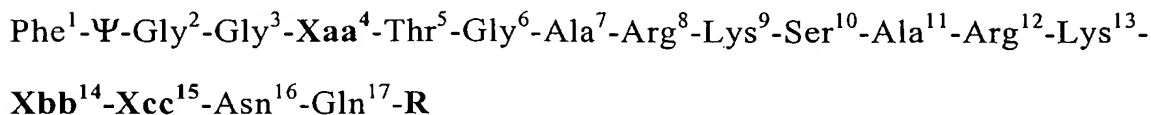
Preparazione	Effetto	N/OFQ		UFP-102	
		pEC ₅₀	E _{max}	pEC ₅₀	E _{max}
CHO _{hNOP}	Stimolazione binding GTP γ S	8.70	10.71 \pm 1.50	10.12	12.26 \pm 1.37
CHO _{hNOP}	Inibizione cAMP	9.86	103 \pm 4%	10.17	104 \pm 3%
MVD	Inibizione della contrazione indotta elettricamente	7.77	91 \pm 2%	9.36	94 \pm 1%
GpI	Inibizione della contrazione indotta elettricamente	8.04	56 \pm 5%	8.98	55 \pm 4%

Studi in vivo

Saggio	Effetto	N/OFQ		UFP-102	
		Dose efficace (nmol)	Durata d'azione	Dose efficace (nmol)	Durata d'azione
Attività locomotoria	Inibizione	1	20 min	0.1	>3 h
Ritrazione della coda	pronocicezione	1	15 min	0.1	> 2 h

RIVENDICAZIONI

1. Peptide analogo di nocicettina avente formula generale (I):



(I)

dove

Ψ rappresenta il legame tra i primi due residui amminoacidici ed è scelto tra CO-NH e CH₂-NH; **Xaa**⁴ è scelto tra pXPhe, dove "X" rappresenta H, Cl, Br, I, F, NO₂, CN e "p" indica la posizione para all'anello fenilico di Phe; Tic, Phg, Atc o Aic, che rappresentano rispettivamente acido tetraidroisochinolin-3-carbossilico, fenilglicina, acido aminotetralincarbossilico, acido aminoindancarbossilico; **Xbb**¹⁴ è scelto tra Trp, Arg, Lys, Leu, Orn, omoArg, acido diaminobutirrico o acido diaminopropionico; **Xcc**¹⁵ è scelto tra Phe, Arg, Lys, Ala, Orn o Trp; **R** rappresenta un gruppo ammidico (-NH₂) o carbossilico (-OH) terminale;

dove i residui amminoacidici o i loro derivati possono essere in configurazione D o L,

e suoi sali farmaceuticamente accettabili.

2. Peptide secondo la rivendicazione 1, in cui Ψ è CO-NH o CH₂-NH; **Xaa**⁴ è Phe, pClPhe, pBrPhe, pIPhe, pFPhe, pNO₂Phe o pCNPhe; **Xbb**¹⁴ è Arg, Lys, Leu o Orn; **Xcc**¹⁵ è Arg, Lys, Ala, Orn o Trp; **R** è -NH₂ o -OH.

3. Peptide secondo la rivendicazione 2, in cui Ψ è CO-NH o CH₂-NH; **Xaa**⁴ è L-pFPhe o L-pNO₂Phe; **Xbb**¹⁴ è L-Arg, L-Lys o L-Leu; **Xcc**¹⁵ è L-Arg, L-Lys o L-Ala; **R** è -NH₂.

4. Peptide secondo la rivendicazione 3, scelto dal gruppo comprendente:



Ψ		Xaa	Xbb	Xcc	R
1	CO-NH	(pF)Phe	Arg	Lys	NH ₂
2	CH ₂ -NH	(pF)Phe	Arg	Lys	NH ₂
3	CO-NH	(pF)Phe	Arg	Arg	NH ₂
4	CH ₂ -NH	(pF)Phe	Arg	Arg	NH ₂
5	CO-NH	(pF)Phe	Lys	Lys	NH ₂
6	CH ₂ -NH	(pF)Phe	Lys	Lys	NH ₂
7	CO-NH	(pF)D-Phe	Arg	Lys	NH ₂
8	CH ₂ -NH	(pF)D-Phe	Arg	Lys	NH ₂
9	CO-NH	(pF)D-Phe	Arg	Arg	NH ₂
10	CH ₂ -NH	(pF)D-Phe	Arg	Arg	NH ₂
11	CO-NH	(pF)Phe	Arg	Ala	NH ₂
12	CH ₂ -NH	(pF)Phe	Arg	Ala	NH ₂
13	CO-NH	(pF)D-Phe	Leu	Lys	NH ₂
14	CH ₂ -NH	(pF)D-Phe	Leu	Lys	NH ₂
15	CO-NH	(pF)Phe	D-Arg	Lys	NH ₂
16	CH ₂ -NH	(pF)Phe	D-Arg	Lys	NH ₂
17	CO-NH	(pNO ₂)Phe	Arg	Lys	NH ₂
18	CH ₂ -NH	(pNO ₂)Phe	Arg	Lys	NH ₂
19	CO-NH	(pNO ₂)Phe	Lys	Lys	NH ₂
20	CH ₂ -NH	(pNO ₂)Phe	Lys	Lys	NH ₂
21	CO-NH	(pNO ₂)Phe	Arg	Arg	NH ₂
22	CH ₂ -NH	(pNO ₂)Phe	Arg	Arg	NH ₂
23	CO-NH	(pNO ₂)Phe	Lys	D-Lys	NH ₂
24	CH ₂ -NH	(pNO ₂)Phe	Lys	D-Lys	NH ₂
25	CO-NH	(pNO ₂)D-Phe	Arg	Lys	NH ₂

(continua)

Ψ		Xaa	Xbb	Xcc	R
26	CH ₂ -NH	(pNO ₂)D-Phe	Arg	Lys	NH ₂
27	CO-NH	(pNO ₂)D-Phe	Arg	Arg	NH ₂
28	CH ₂ -NH	(pNO ₂)D-Phe	Arg	Arg	NH ₂
29	CO-NH	(pNO ₂)Phe	Arg	Ala	NH ₂
30	CH ₂ -NH	(pNO ₂)Phe	Arg	Ala	NH ₂
31	CO-NH	(pNO ₂)Phe	Leu	Lys	NH ₂
32	CH ₂ -NH	(pNO ₂)Phe	Leu	Lys	NH ₂
33	CO-NH	(pNO ₂)Phe	D-Arg	D-Lys	NH ₂
34	CH ₂ -NH	(pNO ₂)Phe	D-Arg	D-Lys	NH ₂
35	CO-NH	(pNO ₂)Phe	Leu	D-Lys	NH ₂
36	CH ₂ -NH	(pNO ₂)Phe	Leu	D-Lys	NH ₂
37	CO-NH	(pF)Phe	Arg	Lys	OH
38	CH ₂ -NH	(pF)Phe	Arg	Lys	OH
39	CO-NH	(pNO ₂)Phe	Arg	Lys	OH
40	CH ₂ -NH	(pNO ₂)Phe	Arg	Lys	OH
41	CO-NH	(pNO ₂)Phe	Lys	Lys	OH
42	CH ₂ -NH	(pNO ₂)Phe	Lys	Lys	OH
43	CO-NH	(pF)Phe	Arg	Arg	OH
44	CH ₂ -NH	(pF)Phe	Arg	Arg	OH

5. Peptide secondo la rivendicazione 4, scelto dal gruppo comprendente

a) H-Phe-Gly-Gly-(pF)Phe-Thr-Gly-Ala-Arg-Lys-Ser-Ala-Arg-Lys-Arg-Lys-Asn-Gln-NH₂

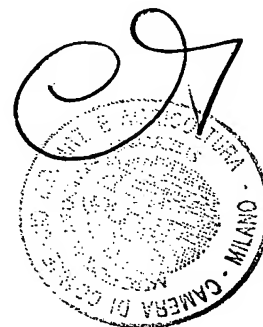
b) H-Phe- Ψ (CH₂NH)-Gly-Gly-(pF)Phe-Thr-Gly-Ala-Arg-Lys-Ser-Ala-Arg-Lys-Arg-Lys-Asn-Gln-NH₂

6. Peptide secondo le rivendicazioni 1-5, per uso come medicamento.
7. Composizione farmaceutica contenente un peptide secondo le rivendicazioni 1-5, insieme ad eccipienti farmaceuticamente accettabili.
8. Uso di un peptide secondo le rivendicazioni da 1 a 5 per la preparazione di un medicamento da utilizzare nel trattamento di disfunzioni, condizioni o stati patologici in cui sia desiderabile ottenere l'attivazione dei recettori NOP.
9. Uso secondo la rivendicazione 8, nel trattamento di ipertensione, tachicardia, malattie da ritenzione idrica, iponatriemia, scompenso cardiaco, disfunzioni della motilità della muscolatura liscia nei tratti gastrointestinale, respiratorio, e genitourinario, stati infiammatori, nell'analgesia periferica o spinale, nell'attenuazione della tosse.
10. Uso secondo la rivendicazione 8, per la preparazione di un analgesico.
11. Uso secondo la rivendicazione 8, per la preparazione di un medicamento utile nel trattamento dell'incontinenza da vescica neurogena e dell'iperattività vescicale.
12. Uso secondo la rivendicazione 8, per la preparazione di un medicamento utile nel trattamento della tosse.
13. Uso secondo la rivendicazione 8, per la preparazione di un medicamento utile nel trattamento dell'iperomotilità gastrointestinale.
14. Uso secondo la rivendicazione 8, per la preparazione di un medicamento utile nel trattamento dell'iponatriemia, dello scompenso cardiaco e dell'ipertensione.
15. Uso secondo la rivendicazione 8, per la preparazione di un medicamento utile nel trattamento del dolore cronico.

Milano, 24 settembre 2002

Il Mandatario
(Banfi Paolo)
di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l.

Pabb





6799 M On.le Ministero delle Attività Produttive
Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

ROMA

La società **ITALFARMACO S.p.A.**, di nazionalità italiana, con sede in Milano, ed elettivamente domiciliata a tutti gli effetti di legge presso i mandatarî Signori Bianchetti Giuseppe ed altri (vedi lettera d'incarico) di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l. – Via Rossini, 8 – Milano

fa domanda di trascrizione

per atto di cessione della domanda di brevetto per invenzione industriale N. MI2002A002022 del 24.9.2002

da: **REGOLI DOMENICO** – Ferrara

a: **ITALFARMACO S.p.A.** – Milano

Documentazione allegata:

- 1) Atto di cessione depositato dalla Dr.ssa Laurino Giuseppina, Notaio in Milano all'Agenzia delle Entrate – Ufficio di Milano 1 in data 16.4.2002;
- 2) Lettera d'incarico;
- 3) Attestazione di versamento sul c/c N. 00668004 di Euro 61,97# emessa in data 5 giugno 2003 al N. 0407.

Cordiali saluti.

Milano, 6 giugno 2003

Il Mandatario
(Banfi Paolo)
di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l.

